

福井大学重点研究 「競争的配分経費」

先天代謝異常症における一酸化窒素代謝系の病態学的意義の探索： 新規の予防・治療法の開発に向けて

研究代表者：塚原 宏一（医学部医学科、講師）

電話：0776-61-8358、メールアドレス：htsuka@u-fukui.ac.jp

共同研究者：巨田 尚子（医学部医学科、助教）、徳力 周子（医学部医学科、助教）

概 要	本研究は昨年度の継続と発展である。2008 年度のおもな研究成果を以下に示す。 (1) 血中 ADMA は胎児・新生児で最も高く、小児、成人に向かうにつれて低くなった。未熟な血管系の緊張維持に ADMA 系が主体的に作動する可能性が示唆された。(2) 肝障害を伴わない先天性肝内門脈-静脈シャントの患者では、血中 ADMA、endothelin-1 が高く、血中 NO が低く、血中 TBARS などの酸化ストレスマーカーが高かった。シャント率は血中 ADMA、ADMA/NO 比と正の相関を示した。門脈-静脈シャント自体が NO-ADMA 系での ADMA 優位、酸化ストレス亢進をもたらすこと、肝臓がレドックス制御の重要臓器であることが示唆された。(3) 先天性尿素サイクル異常 (OTC、ASS、ASL の各異常) を有しアルギニン補充を受けている患者では、OTC 異常では血中 NO がアルギニンに正相関して高く、ASS 異常では血中 NO がアルギニンに負相関して低く、ASS、ASL 異常では血中 ADMA がシトルリンに正相関して高かった。特に ASS 異常では ADMA/NO 比が高く、血管内皮機能不全の存在が示唆された。(4) シトルリン欠損症を有しているが、見かけ上健常な患者では対照と比べて、血中 NO、ADMA に差はないが、血中コレステロールが高く、酸化型 LDL などの酸化ストレスマーカーが高かった。乳児期以降の silent phase でも脂肪代謝障害、酸化ストレス亢進が存在することが示されたが、それが成人期の肝障害・脳神経障害の形で再発症と関連すると思われる。以上はすべて過去に報告のない知見である。
関連キーワード	asymmetric dimethylarginine、metabolic disorder、nitric oxide、urea cycle

研究の背景および目的

本発表者らは、ヒトの生体制御が一酸化窒素 (NO) をとりまく L-arginine / NO 合成酵素 / NO 系と protein-arginine methyltransferase (PRMT: タンパク質中の L-arginine 残基をメチル化する酵素) / asymmetric dimethylarginine (ADMA: 内因性の NO 合成阻害因子) / dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH: ADMA を特異的に分解する酵素) 系の相互作用により統御されるという仮説を持っている。

これらの系を追究することは、複雑な生体ネットワークの生物学的理解をさらに進めるだけでなく、小児科領域の多様な疾患群の予防・治療、身

体機能維持、QOL 向上を目指した新規の低侵襲的で効果的な管理法の開発につながると考えられる。

上記の NO-ADMA 系は、肝臓だけでなく腎臓、血管などの重要臓器において尿素サイクル・アミノ酸代謝系を介しながら、好氣的解糖、酸化的リン酸化、タンパク質合成にも関連すると想定される。

先天代謝異常症は代謝の要となる諸酵素の欠損・機能異常に起因するが、代謝ネットワークの関連から NO-ADMA 系を偏倚させ、そのことが病像の多様性と重篤な合併症を導くと推測される。逆に、NO-ADMA 系に介入することで、原病の予防や治療も可能になると期待される。

研究の成果

おもな研究成果を以下に示す。生体マーカーとして血中・尿中 NO 代謝物 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$)、血中 ADMA、血中 TBARS、酸化型 LDL、尿中 acrolein-lysine、8-OHdG などの酸化ストレスマーカーを計測した。結果は平均値で表した。

(1) 対象は胎児・新生児 (臍帯静脈)、小児、成人である。各群で血中 ADMA は 1.71、0.71、0.52 $\mu\text{mol/L}$ 、血中 NO は 23.3、43.4、40.8 $\mu\text{mol/L}$ 、ADMA/NO 比は 0.085、0.020、0.019 であった。血中 ADMA (または ADMA/NO 比) は胎児・新生児で最も高く、小児、成人に向かうにつれて低くなった。未熟な血管系の緊張維持に ADMA 系が主体的に作動する可能性が示唆された (Metabolism 2008)。

(2) 肝障害を伴わない先天性肝内門脈-静脈シャントの患者では対照と比べて、血中 ADMA (0.82 対

0.63 $\mu\text{mol/L}$)、ADMA/NO 比 (0.052 対 0.023)、ET-1 (3.0 対 1.9 pg/mL) が高く、NO (22 対 30 $\mu\text{mol/L}$) が低く、血中 TBARS (5.0 対 3.9 mmol/L)、尿中 acrolein-lysine (331 対 255 nmol/mg Cr)、8-OHdG (26 対 19 ng/mg Cr) が高かった。シャント率は血中 ADMA、ADMA/NO 比と正の相関を示した。肝硬変などの後天性シャントと違い、今回の患者は肝障害をほとんど呈していない。よって、シャント自体が NO-ADMA 系での ADMA 優位、酸化ストレス亢進、血管内皮機能不全をもたらすこと、肝臓がレドックス制御の重要臓器であることが示唆された (Metabolism に修正論文を投稿中)。

(3) 先天性尿素サイクル異常 (OTC、ASS、ASL の各異常) を有している患者 (アルギニン補充を受けてその血中濃度は基準値の約 2 倍に達してい

る)では対照と比べて、OTC 異常では血中 NO がアルギニンに正相関して高く (67 対 39 $\mu\text{mol/L}$)、ASS 異常では血中 NO がアルギニンに負相関して低く (22 対 39 $\mu\text{mol/L}$)、ASS、ASL 異常では血中 ADMA がシトルリンに正相関して高かった (それぞれ 1.42、1.13 対 0.51 $\mu\text{mol/L}$)。特に ASS 異常では ADMA/NO 比が高かった (0.061 対 0.019)。ASS はシトルリン→アルギニンの律速酵素であるが、その異常ではアルギニン補充下でも ADMA/NO 比が高く、血管内皮機能不全が存在することが示唆された (Metabolism 2009)。

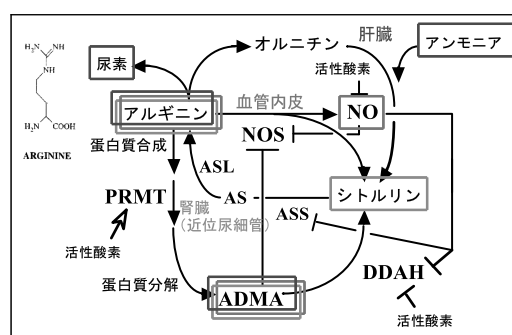
(4) 別の尿素サイクル異常であるシトルリン欠損症を有している患者 (乳児期に“肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎”を起こした後、現在は軽度の高シトルリン血症を呈するのみで見かけ上健常である) では対照と比べて、血中 NO、ADMA に差はないが、血中コレステロール (213 対 169 mg/dL)、酸化型 LDL (82 対 25 U/L)、SOD (1.49 対 1.06 U/mg protein in RBC)、catalase (3.60 対 2.96 pmol/mg protein in RBC)、尿中 acrolein-lysine (481 対 272 nmol/mg Cr)、8-OHdG (67 対 19 ng/mg Cr) が高かった。シトルリン欠損症患者の約 1/10 は成人期に、重篤な肝障害 (脂肪肝、線維化)・精神神経障害 (てんかん、意識障害、統合失調症、うつ病) を発症する。乳児期以降の silent phase でも脂肪代謝障害、酸化ストレス亢進が存在することが示されたが、それが成人期の再発症の機序と関連すると思われた (Mol Genet Metab 2009)。

(5) 酸化ストレスマーカーの臨床応用: 2008 年 3 月の小児医学川野賞受賞の記念講演 (埼玉)、4 月の日本感染症学会での特別講演 (島根) など、尿を用いた酸化ストレスマーカー・セット検査の現状と今後の展開を述べた。このことが契機になり、他施設との共同研究が進んでいる。腎性低尿酸血症 (腎臓の尿酸トランスポーターに異常があり、非ミオグロビン性運動後急性腎不全をきたす)、他のアミノ酸代謝異常症 (フェニルケトン尿症な

ど)、血球貪食性リンパ組織球増殖症などである。**研究成果の総括と今後の展開**

NO-ADMA 系は帰還回路を巡らせながら血管機能を制御する。一方、アルギニンを中心とする尿素サイクルは肝臓が主体的であるが、それは不完全ながら多くの臓器・組織に分布し機能する。腎臓、血管内皮ではシトルリン→アルギニン→NO の経路が重要である。尿素サイクルはミトコンドリアでは好氣的解糖、酸化的リン酸化、細胞質では嫌氣的解糖、糖新生と緊密に関連する。

研究成果 (2) ~ (4) により、肝臓機能が正常に機能しない状況では NO-ADMA 系での ADMA 優位あるいは酸化ストレス亢進がもたらされることが示された。肝-腎-血管-肺-脳などの多臓器連関の重要性が科学的データに基づいて再確認された。



本発表者は、NO-ADMA 系や酸化ストレスの生体マーカーは単に病態生理や治療介入の評価の指標としてではなく、疾患分類の再構築や特殊疾患の鑑別、重篤な先天異常疾患に対する新規の効果的予防・治療の開発にも有用と考えている。ここ数年発表した一連の論文が橋渡しになって、現在、国内外の多くの研究者と共同研究を進めている。今後も継続して、多種多様の先天代謝異常症の解析を行う予定である。

特記事項・発表論文など

特記事項: 本研究は、福井大学医学部小児科の畑 郁江先生、大嶋勇成先生、眞弓光文先生、同看護学科の重松陽介先生、同産婦人科の西島浩二先生、高橋 仁先生、小辻文和先生、大阪市立大学医学部小児科の岡野善行先生、千葉県こども病院小児科の長坂博範先生、鹿児島大学医学部医化学講座の小林圭子先生、防衛医科大学校分子生体制御学講座の松尾洋孝先生、四ノ宮成祥先生のご指導・ご協力を得て進められている。深謝いたします。
発表論文など: 2007 年以降 2008 年 2 月までに発表あるいは受理された欧文論文の総計は 9 編、それらの IF の総計は 22.9 であった。この間に査読した欧文論文の総計は 32 編であった。本研究に関連する代表的論文を列挙する。
・Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, et al. Determination of asymmetric dimethylarginine, an endogenous NO synthase inhibitor, in umbilical blood. Metabolism 57:215-220, 2008.
・Nagasaka H, Miida T, Hirano K, et al. Reduced apolipoprotein E-rich high-density lipoprotein level

at birth is restored to the normal range in patients with familial hypercholesterolemia in the first year of life. J Clin Endocrinol Metab 93:779-783, 2008.
・Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, et al. Clinical significance of the balance between the L-arginine/NOS/NO pathway and the PRMT/ADMA/DDAH pathway. J Dev Nephrol 16:21-28, 2008.
・Nagasaka H, Tsukahara H, Yorifuji T, et al. Evaluation of endogenous nitric oxide synthesis in congenital urea cycle enzyme defects. Metabolism 58:278-282, 2009.
・Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, et al. Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrullin-deficiency even during the silent period. Mol Genet Metab 2009 (Jan 25; Epub ahead of print).